

University of Groningen

Endophytes as alternative paclitaxel sources

Staniek, Agata Agnieszka

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2010

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Staniek, A. A. (2010). *Endophytes as alternative paclitaxel sources: chemistry and genetics of Taxomyces andreanae and the endophytic flora of Wollemia nobilis*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Streszczenie

Atakowane przez patogeny, korzystające z harmonii symbiozy czy też nie zdradzając żadnych objawów, rośliny nieustannie uczestniczą w molekularnej współpracy z różnorodnymi klasami mikroorganizmów. Jednym ze sposobów komunikacji w owym wzajemnym oddziaływaniu są metabolity wtórne. Tak implikowana chemiczna różnorodność niosąca farmaceutyczny potencjał wykracza więc poza królestwo roślin i oferuje poszerzony pogląd obiecujący zamienić migawki redukcjonistycznego myślenia dominującego naukę minionych lat na pełen obraz biologii systemowej. Endofity zdają się idealnie pasować do tego naturalnego ‘magazynu’, z którego bogactwa zdołaliśmy do tej pory uszczknąć jedynie odrobinę.

Wstęp niniejszej dysertacji (**rozdział 2**) dostarcza gruntownej oceny obecnego stanu wiedzy na temat organizmów endofitycznych – mikrobow (głównie grzybów) kolonizujących wewnętrzne tkanki wszystkich gatunków roślin i tym samym tworzących ogromną bioróżnorodność dotąd nieznaną oryginalnych produktów naturalnych mogących odegrać znaczącą rolę na arenie farmaceutycznej (Staniek *et al.*, 2008).

Paklitaksel, pierwszy na świecie lek przeciwnowotworowy przynoszący bilionowe zyski, wyizolowano pierwotnie z kory cisu zachodniego (*Taxus brevifolia*). Podczas gdy poszukiwanie alternatywnych źródeł tego niezwykle skutecznego cytostatyku przyniosło szereg publikacji o endofitach zdolnych do jego produkcji wywołując sporo kontrowersji w ciągu dwóch ostatnich dekad, światowy rynek nadal polega na zasobach paklitakselu pozyskiwanego z surowców roślinnych.

Głównym celem badań przedstawionych w dysertacji jest ocena wszystkich intrygujących aspektów potencjału endofitów jako alternatywnych źródeł paklitakselu. Z jednej strony usiłuje ona rozwikłać tajemniczość otaczającą pierwszego z sugerowanych endofitycznych producentów cytostatyku, *Taxomyces andreanae*, wyizolowanego z cisu, a więc pierwotnego, roślinnego ‘dostawcy’ leku (Stierle *et al.*, 1993) (**rozdział 3**). Z drugiej zaś, w odpowiedzi na niezwykle odkrycia minionych lat (Hill, 1996; Strobel *et al.*, 1997), opisuje izolację oraz badanie endofitycznej flory kolonizującej prehistoryczne drzewo iglaste, wolemię szlachetną (*Wollemia nobilis*) w poszukiwaniu kolejnych okazów syntetyzujących paklitaksel (**rozdział 6**). Równolegle do stosowania dominujących w literaturze metod chromatograficznych, spektroskopowych i immunoenzymatycznych służących detekcji taksanów w kulturach endofitów, usiłowano nadać procedurze badawczej alternatywny, bezprecedensowy przebieg i odpowiedzieć na pytanie czy molekularny wzór biosyntezy paklitakselu jest nieodłączną, genetyczną cechą

badanych mikroorganizmów. Dogłębna, oparta o jedną z podstawowych technik genomiki funkcjonalnej – łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), analiza *syntazy taksadienu* oraz *transferazy fenyłowopropanoylowej bakkatyny III* jako docelowych genów nie tylko jasno sugeruje możliwość wyjaśnienia endofitycznej ścieżki metabolizmu wtórnego, prowadzącej do biosyntezy paklitakselu, lecz pozwala także spekulować na temat genezy taksanów w królestwie grzybów. Z jednej strony, grzyby mogą stanowić system o niezależnej ewolucji produkcji paklitakselu. Jednakże fakt, iż biosynteza tego niezwykle rozbudowanego, unikatowego diterpenoidu *in planta* wymaga około 20 genów (Walker & Croteau, 2001) czyni powyższą tezę mało prawdopodobną. Dlatego wydaje się wiarygodne, że horyzontalny transfer informacji genetycznej mógł ukształtować trajektorie ewolucji taksonomicznie niespokrewnionych, lecz koegzystujących gatunków oraz wpłynąć na rozprzestrzenienie endofitycznych producentów taksanów w danym ekosystemie oraz, idąc dalej, na całym świecie (Staniek *et al.*, 2009; Staniek *et al.*, 2010b).

Ponadto, postulat utożsamiający horyzontalny transfer genów (HGT) z siłą wiodącą w ewolucji klasterów genów u grzybów – zjawisko uważane obecnie za nieodłączną cechę grzybowych genomów (Keller & Hohn, 1997; Keller *et al.*, 2005), stwarza intrygujące pytanie czy geny odpowiedzialne za formację paklitakselu u *Taxomyces andreanae* i innych endofitycznych producentów taksanów są rzeczywiście zgrupowane w klaster. Posiadanie tej istotnej wiedzy genetycznej połączone z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi pozwalających na manipulację w biosyntetycznej maszynierii mogłoby spowodować wejście badań nad alternatywnymi producentami paklitakselu w nowy kombinatoryczny etap. Podczas gdy kilka heterologicznych systemów, jak *Escherichia coli* (Huang *et al.*, 2001), *Saccharomyces cerevisiae* (DeJong *et al.*, 2006; Engels *et al.*, 2008) i *Pichia pastoris* (Schmeer & Jennewein, 2009) zostało już wykorzystanych do ekspresji genów cisu kodujących enzymy wczesnych kroków w biosyntezie paklitakselu, inżynieria i komobilizacja funkcjonalnego kalsteru genów u oryginalnego producenta posiada bezsporną zaletę obecności i funkcjonalności wszelkich elementów regulujących. W obliczu wniosków płynących z dogłębnej analizy czystego szczepu *Taxomyces andreanae*, to niewątpliwie obiecujące podejście zdaje się stanowić tym większe wyzwanie. Mianowicie, pomimo kultywacji na szeroka skalę, analiza metabolitów komercyjnego izolatu nie przyniosła potwierdzenia produkcji paklitakselu przez endofit w aksenicznych warunkach hodowli. Wynik ten sugeruje, że specyficzne środowisko roślinne może być

niezbędne do indukcji genów biosyntezy paklitakselu grzybowego symbionta. Identyfikacja specyficznych mechanizmów indukujących otwórz perspektywę nie tylko poznania prawdziwej natury wyrafinowanego ekwilibrium interakcji pomiędzy roślinami a mikroorganizmami, lecz także odkrycia pełni ich ogromnego potencjału terapeutycznego. Jedyne dotychczas, niedawno opublikowane doniesienie komunikuje bezprecedensową próbę przywrócenia intrygującej współzależności proponując obiecujący system ko-hodowli cisu chińskiego, *Taxus chinensis* var. *mairei* i jego endofitu, *Fusarium mairei* (Li *et al.*, 2009). Dalszym wyzwaniem jest integracja wyżej wymienionych nowatorskich założeń i ukształtowanie wszechstronnego poglądu na sposób, w jaki historyczne rysy obu ‘graczy’ oddziałują z otaczającym środowiskiem, kształtują trajektorie ewolucji (Burdon & Thrall, 2009).

Wolemia szlachetna (*Wollemia nobilis*), wspomniany wcześniej gospodarz endofitów syntetyzujących paklitaksel, stanowi ekscytujący przedmiot badań *per se*. Jej rozpoznanie w roku 1994, okrzyknięte mianem ‘botanicznego odkrycia XX wieku’, otworzyło drzwi do niewyobrażalnie odległej przeszłości, umożliwiając studia nad gatunkiem uważanym za wymarły przez miliony lat. **Rozdział 4** opisuje starania pozyskania kallusa i zawiesiny komórek wolemii szlachetnej. Choć celu ostatecznie nie osiągnięto, pomimo zakrojonej na znaczną skalę optymalizacji warunków hodowli *in vitro*, nie należy zaprzestawać dążeń, które mogą okazać się kamieniem milowym na drodze do rozwiązania botanicznej enigmy tej ‘żyjącej skamieliny’. W **rozdziale 5** szczególną uwagę zwrócono na chemię wolemii szlachetnej, proponując analizę porównawczą składu olejków eterycznych pozyskanych z różnych organów rośliny, mianowicie liści i gałązek. Otrzymane wyniki pozwalają na spekulację dotyczącą istoty formacji ‘aktywnych jednostek izoprenowych’ – podstawowego budulca związków terpenoidowych, powstających na drodze alternatywnych ścieżek metabolicznych. Podczas gdy znana od dawna, zlokalizowana w cytozolu, ścieżka mewalonianowa (MVA) dostarcza jednostek izoprenowych do biosyntezy seskwiterpenów, specyficzna dla plastydów ścieżka fosforanu metylerytritolu (MEP), odkryta i badana stosunkowo niedawno przez grupę Rohmera (znana także jako *ścieżka Rohmera*) zasila formację mono- i diterpenów. Wspomniana kompartmentacja zdaje się odzwierciedlać postulowany bezpośredni wpływ światła na ścieżkę nie-mewalonianową oraz wewnątrzkomórkową kros-komunikację pomiędzy cytoplazmatycznym i plastydowym szlakiem biosyntezy. Stąd też znacznie wyższe ilości seskwiterpenoidów odnotowane w organach o mniej

nasilonej aktywności fotosyntetycznej i w mniejszym stopniu wystawionych na działanie promieniowania świetlnego niż liście obfitujące w związki mono- i diterpenowe (Staniek *et al.*, 2010a).

Podsumowując, dociekania przedstawione w niniejszej dysertacji badają potencjał endofitów jako jeszcze niepoznanego obfitego źródła produktów naturalnych o znaczeniu farmaceutycznym, skupiając uwagę jednoznacznie na paklitakselu. Podczas gdy wysoce pożądane poszukiwania niewyczerpalnych i ekonomicznie opłacalnych źródeł tego doskonałego cytostatyku kuszą do wyciągania przedwczesnych wniosków proklamujących endofity jako niezależne ‘bio-fabryki taksanów’, niniejsza rozprawa argumentuje, iż odpowiedź na wyczerpanie dostępnych zasobów paklitakselu może kryć się we wzajemnej interakcji roślin (często niezwykle wyjątkowych, jak prechistoryczna *Wollemia nobilis*) z zasiedlającymi je mikroorganizmami pod ewolucyjną i ekologiczną kontrolą. Mimo świadomości ogromu wyzwania, bogactwo innowacyjnych możliwości wydaje się niezaprzeczalne w rodzącej się dobie genomiki funkcjonalnej i biologii systemowej.

Literatura

- Burdon JJ, Thrall PH. 2009. Coevolution of plants and their pathogens in natural habitats. *Science* 324:755-756
- DeJong JM, Liu Y, Bollon AP, Jennewein S, Williams D, Croteau R. 2006. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech Bioeng* 93:212-224
- Engels B, Dahm P, Jennewein S. 2008. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (paclitaxel) production. *Metab Eng* 10:201-206
- Hill KD. 1996. The Wollemi pine: discovering a living fossil. *Nat Res* 32:20-25
- Huang Q, Roessner CA, Croteau R, Scott AI. 2001. Engineering *Escherichia coli* for the synthesis of taxadiene, a key intermediate in the biosynthesis of Taxol. *Bioorg Med Chem* 9:2237-2242
- Keller NP, Hohn TM. 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fung Gen Biol* 21:17-29
- Keller NP, Turner G, Bennett JW. 2005. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3:937-947
- Li Y-C, Tao W-Y, Cheng L. 2009. Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:233-239

- Schmeer H, Jennewein S. 2009. Bioorganic synthesis of the key taxoid precursor taxa-4(5),11(12)-diene using a one-pot, two enzyme catalyzed reactions. Enzyme Engineering XX. Groningen, the Netherlands
- Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. 2008. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. J Plant Interact 3:75-93
- Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. 2009. *Taxomyces andreanae*: a presumed paclitaxel producer demystified? Planta Med 75:1561-1566
- Staniek A, Muntendam R, Woerdenbag HJ, Kayser O. 2010a. Essential oil constituents derived from different organs of a relictual conifer *Wollemia nobilis*. Biochem Syst Ecol, DOI 10.1016/j.bse.2009.12.022 (published online February 4, 2010)
- Staniek A, Woerdenbag HJ, Kayser O. 2010b. Screening the endophytic flora of *Wollemia nobilis* for alternative paclitaxel sources. J Plant Interact (accepted for publication January 11, 2010)
- Stierle A, Strobel GA, Stierle DB. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science 260:214-216
- Strobel GA, Hess WM, Li JY, Ford E, Sears J, Sidhu RS, Summerell B. 1997. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*. Austr J Bot 45:1073-1082
- Walker K, Croteau R. 2001. Taxol biosynthetic genes. Phytochemistry 58:1-7

